

UNTERSUCHUNGEN ZUR TECHNIK
DER INTRAERYTHROCYTÄREN ENZYMAKTIVITÄTSBESTIMMUNG
IM VOLLBLUT UND AN GEWASCHENEN ERYTHROCYTEN

Hubert Franke

Mainz 1972





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554401_0073

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr.H.P. Wolff)

UNTERSUCHUNGEN ZUR TECHNIK
DER INTRAERYTHROCYTÄREN ENZYMAKTIVITÄTSBESTIMMUNG
IM VOLLBLUT UND AN GEWASCHENEN ERYTHROCYTEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Hubert Franke
aus Limbach/Sachsen

Mainz 1972



Dekan:

Professor Dr. K.H. Bäßler

Referent:

Professor Dr. W.G.A. Ohler

Korreferent:

Professor Dr. H.P. Wolff

Tag der mündl. Prüfung: 7.12.72

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Besonderheiten des Erythrocyten- stoffwechsels	4
III. Zellalter und Enzymaktivität	4
IV. Zellgröße und Enzymaktivität	7
V. Fragestellung der Arbeit	8
VI. Material und angewandte Methoden	
1. Aufbereitung des Blutes	9
2. Bestimmung der Enzymaktivitäten	12
VII. Ergebnisse	17
VIII. Diskussion der Ergebnisse	37
IX. Zusammenfassung	42
X. Literaturverzeichnis	43

I. Einleitung

Zu den hämolytischen Anämien zählt auch eine Gruppe kongenitaler hämolytischer Erkrankungen, bei der die verkürzte Erythrocytenlebenszeit sich weder auf Zellformabartigkeiten, Hämoglobinanomalien, noch auf immunologische oder toxisch bedingte Hämolysen zurückführen läßt. Die klinische Symptomatik ähnelt sehr stark jener der Sphärocytose, unterscheidet sich jedoch grundlegend von dieser Krankheit durch das Fehlen der Sphärocyten, die normale osmotische Resistenz und die fehlende oder nur unzureichende Beeinflussung durch die Splenektomie. HADEN (13) berichtete 1947 von solchen Patienten.

Eine Einteilung dieser Krankheitsgruppe nach pathogenetischen Gesichtspunkten wurde erst möglich, nachdem intraerythrocytäre Enzymdefekte als Ursache für den vorzeitigen Erythrocytenuntergang gefunden wurden.

Als ersten intraerythrocytären Enzymdefekt fanden CARSON und Mitarbeiter 1956 (7) und unabhängig davon WALLER und Mitarbeiter 1957 (45) den Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel in roten Blutzellen als Ursache für die Hämolyse. VALENTINE und Mitarbeiter (42) entdeckten 1961 den Pyruvatkinase-Mangel. In den folgenden Jahren wurden weitere, mit einer hämolytischen Anämie einhergehende intraerythrocytäre Enzymdefekte nachgewiesen. Die bisher bekannten Enzymmangelzustände sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie betreffen den Kohlehydrat- und Glutathionstoffwechsel der Erythrocyten.

Defekt	Klinische Manifestation	Autor
<u>Glykolyse</u>		
Hexokinase	I. kongenitale NSHA ¹⁾ II. Fanconi-Anämie (in einem Teil der Fälle Hexokinase-Mangel)	VALENTINE et al. (41) LÖHR et al. (27)
Triosephosphatisomerase	kongenitale NSHA	SCHNEIDER et al. (38)
2,3-Diphosphoglyceratmutase	kongenitale NSHA	LÖHR u. WALLER (24)
Phosphoglyceratkinase	kongenitale NSHA	KRAUS et al. (19)
Pyruvatkinase	kongenitale NSHA	TANAKA et al. (40) WIESMANN u. Tönz (47)
<u>Glutathion-stoffwechsel</u>		
Glukose-6-phosphat-dehydrogenase	I. keine ohne Exposition, akute Hämolyse nach Exposition II. kongenitale NSHA	GEHRMANN et al. (11) CARSON et al. (7) MESSERSCHMIDT u. SUAUDEAU (32) WALLER et al. (45) FLATZ (10)
6-Phosphoglukonat-dehydrogenase		LAUSECKER et al. (21)

Tab.1. Genetisch bedingte Enzymdefekte der Erythrocyten und ihre klinischen Manifestationen. Modifiziert nach HASCHEN (14).

¹⁾ Nichtsphärocytäre, hämolytische Anämie

Intraerythrocytäre Enzymbestimmungen haben damit eine entscheidende Bedeutung für die Diagnose nichtsphärocytärer, enzymopenischer hämolytischer Anämien erlangt (LÖHR und WALLER (26)).

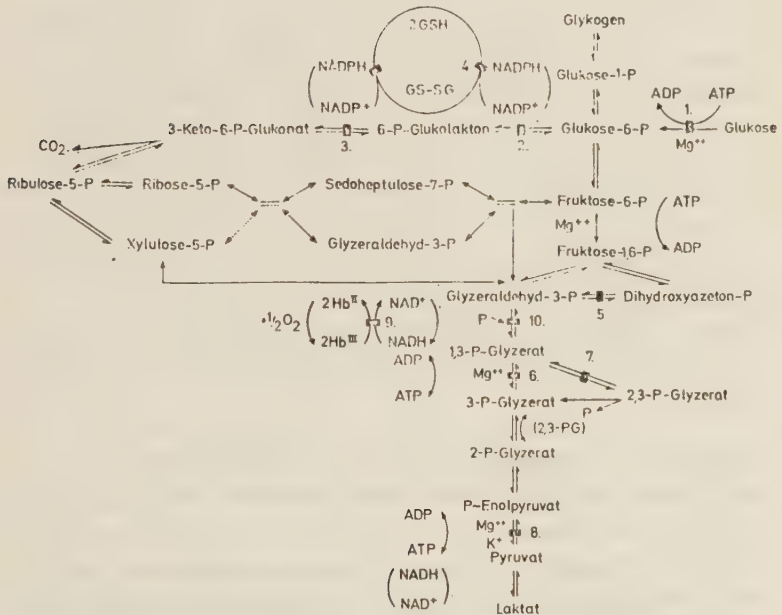


Abb. 1. Schematische Darstellung von Enzymopathien in Erythrocyten: 1. Hexokinasemangel, 2. Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel, 3. 6-Phosphoglukonatdehydrogenase-Mangel, 4. Glutathionreduktase-Mangel, 5. Triosephosphatisomerase-Mangel, 6. 3-Phosphoglycerat-1-Kinase-Mangel, 7. 2,3-Diphosphoglyceromutase-Mangel, 8. Pyruvatkinase-Mangel. Sie sind mit hereditären, enzymopenischen hämolytischen Anämien verbunden.

II. Besonderheiten des Erythrocytenstoffwechsels.

Menschliche Erythrocyten unterscheiden sich von anderen Körperzellen unter normalen Bedingungen hinsichtlich ihres fehlenden Zellkerns und ihres Stoffwechsels. Sie sind als ausgereifte Zelle weder in der Lage Desoxiribonucleinsäure, Ribonucleinsäure, Lipide, Proteine noch Hämoglobin zu synthetisieren. Der Citronensäurecyclus und der Glycerin-1-Phosphatcyclus stehen ihnen nicht zur Verfügung. Als energieliefernde Reaktionswege bleiben ihnen nur die Glykolyse und der Pentosephosphatcyclus (LÖHR (22)). Enzymdefekte dieser beiden Stoffwechselwege müssen daher zu schweren Stoffwechselstörungen und zum vorzeitigen Zelluntergang führen, während andere, kernhaltige Körperzellen mit vollständigem Stoffwechsel diese Defekte kompensieren können.

Bei Enzymdefekten der Glykolyse (Abbildung 1) ist vor allem die Adenosintriphosphat(ATP)- Bildung gestört. Ungenügende ATP- Bildung schädigt die Funktion und Struktur der Erythrocytenmembran u.a. durch Beeinträchtigung des ATP- bedürftigen Jonentransports durch die Zellmembran. Die Stilllegung der Kathionpumpe bewirkt einen Einstrom von Natrium in die Zelle und einen Ausstrom von Kalium aus der Zelle. Dadurch kommt es zur osmotischen Hämolyse und zum Krankheitsbild der enzymopenischen hämolytischen Anämie. Diese These wurde unter anderem von SCHRÖTER (39) erwähnt.

III. Zellalter und Enzymaktivität.

Auch in anderer Hinsicht haben intraerythrocytäre Enzymbestimmungen das Interesse der Klinik ge-

funden. Die intraerythrocytären Enzymaktivitäten können ein Parameter für das Zellalter der Erythrocytenpopulation im peripheren Blut sein (WALLER (44), MARKS (31)). In Tabelle 2 sind beispielhaft die Meßergebnisse verschiedener intraerythrocytärer Enzyme bei hämolytischen Anämien aufgeführt, um diesen Sachverhalt zu demonstrieren. Für den Zusammenhang zwischen Zellalter und Stoffwechselaktivität spricht der erhöhte Glukoseverbrauch der Reticulocyten und jungen Erythrocyten (WITT et al. (49)). Mit der Zellalterung nimmt die Aktivität verschiedener glykolytischer Fermente ab (LÖHR et al. (29)). Bluterkrankungen, die mit erhöhten Reticulocytenwerten einhergehen, zeigen meist hohe Enzymaktivitäten (HENNEMANN (15), HUBER et al. (17), MARKS (30), LÖHR et al. (29)). Über die Erhöhung der Glukose-6-Phosphatdehydrogenaseaktivität der Erythrocyten bei verschiedenen hämolytischen Anämieformen wurde mehrfach berichtet (HENNEMANN (15), MARKS (30), MICHOT und MARTI (33), CIRESA (8)). Die Ursache der Hämolyse spielt dabei keine Rolle.

Enzymopenische hämolytische Anämien zeigen oft besonders deutlich den Gegensatz zwischen allgemein erhöhtem intraerythrocytären Enzymniveau und dem Enzymdefekt selbst (Tabelle 3). Dies kann einmal auf die beschriebene Enzymaktivitätserhöhung bei jugendlichen Zellformen zurückgeführt werden, zum anderen wird angenommen, daß die Erhöhung der Enzymaktivitäten auch als Steigerung der Stoffwechselwege des Glukoseabbaus zur Kompensation des Enzymdefekts aufzufassen sind (MARKS (30)).

IV. Zellgröße und Enzymaktivität.

Schließlich fanden sich auch Zusammenhänge zwischen Zellgröße und Enzymaktivitätshöhe. So konnte von mehreren Autoren nachgewiesen werden, daß "erhöhte Enzymaktivitäten" im Normalbereich liegen können oder "normale Aktivitäten" erniedrigt sind, wenn man nicht wie üblich die Zellzahl, sondern das Zellvolumen als Bezugssystem benutzt (LÖHR, WALLER et al. (28), BOCK et al. (4), HUBER et al. (17)). Dadurch gewinnt die Methode der Enzymaktivitätsbestimmung, bzw. das Bezugssystem, welches der Berechnung der Aktivitäten zugrunde gelegt wird, eine besondere Bedeutung.

Enzym	Standard- bereiche ¹⁾ $\bar{x}$ +s -s	M.W.	A.W.	J.H.	E.K.	A.S.	C.H.	M.S.
Hexokinase	1,9 0,3	2,9	2,8	3,1	2,7	-	3,9	5,2
Aldolase	9,0 0,6	14,3	17,1	10,5	21,2	21,0	14,3	19,3
PGK	297,0 33,0	460,0	430,0	408,0	542,0	-	422,0	509,0
GAPDH	212,0 31,0	465,0	400,0	352,0	-	-	381,0	475,0
PGM I	18,1 5,8	-	14,9	15,3	16,0	-	21,5	28,2
PGM II	102,0 19,0	65,0	76,0	86,4	93,0	-	99,0	86,5
PK	45,0 6,5	36,4	72,0	49,5	52,0	65,0	57,0	57,8
LDH	367,0 62,5	435,0	436,0	340,0	615,0	448,0	570,0	495,0
G-6-PDH	18,0 3,6	32,0	31,0	15,0	33,0	27,4	26,0	34,1
6-PGDH	10,0 3,0	22,0	22,0	9,7	13,9	21,2	17,5	23,0
T/2 (Tage)	29	-	13	16	15	20	25	-
Reticulo- cyten (%)	10	146	68	18	51	104	84	-
Alter (Jahre)		30	53	66	34	44	8	65

Tab.2. Intraerythrocytäre Enzymaktivitäten von sieben Patienten mit hämolytischen Anämien (keine enzymopenischen hämolytischen Anämien). Zur Demonstration des gesteigerten Erythrocytenumsatzes sind Reticulocyten und die Halbwertszeit der Elimination von Cr⁵¹ markierten Erythrocyten (T/2) aus dem Blut angegeben.

Enzym	Standard- bereiche		K.E.	M.D.	H.M.	T.F.	T.B.
	$\bar{x}$	$\pm s$					
Hexokinase	1,9	0,3	2,7	1,8	2,2	1,7	2,2
Aldolase	9,0	0,6	21,2	13,5	11,0	14,1	15,4
PGK	297,0	33,0	542,0	424,0	480,0	-	-
PGM I	18,1	5,8	16,2	7,2	22,8	-	-
PGM II	102,0	19,0	93,0	61,0	107,0	-	-
GAPDH	212,0	31,0	197,0	380,0	311,0	-	-
PK	45,0	6,5	<u>31,2</u>	<u>31,0</u>	<u>24,8</u>	<u>20,8</u>	<u>20,4</u>
LDH	367,0	62,5	615,0	418,0	380,0	408,0	338,0
G-6-PDH	18,0	3,6	31,5	<u>10,9</u>	21,0	19,4	19,9
6-PGDH	10,0	3,0	13,9	17,8	14,5	16,6	15,5

Tab.3. Intraerythrocytäre Enzymaktivitäten von fünf Patienten mit enzymopenischen hämolytischen Anämien. Es wird der Gegensatz zwischen Enzymdefekt und allgemein erhöhten Enzymaktivitäten deutlich.

V. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dargestellt wurde, haben intraerythrocytäre Enzymuntersuchungen große klinische Bedeutung erlangt. Für die Beurteilung der Enzymaktivitäten ist es, wie sich herausgestellt hat, von wesentlicher Bedeutung, welches Bezugssystem der Aktivitätsbestimmung zugrunde gelegt wird. Bisher wurden im allgemeinen die Enzymaktivitäten auf eine definierte Zahl von Erythrocyten bezogen. Besonders bei makrocytären Anämien hat es sich jedoch als sinnvoll erwiesen, die Enzymaktivitäten und Stoffwechselleistungen auf das Volumen zu berechnen, um die aktiven Enzymkonzentrationen zu erfassen (LÖHR et al. (28)). Dadurch erklären sich auf den ersten Blick unverständliche, ja widersprüchliche Untersuchungsergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob schon bei klinisch gesunden Erwachsenen Aktivitätsunterschiede beim Bezug der Enzymaktivitäten auf die Erythrocytenzahl oder das Erythrocytenvolumen nachzuweisen sind.

Außerdem soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit im Plasma vorhandene endogene Substrate und in anderen Blutzellen (Leukocyten, Thrombocyten) vorhandene Enzymaktivitäten einen nachhaltigen Einfluß auf die Höhe der mit unterschiedlicher Technik ermittelten intraerythrocytären Enzymaktivitäten haben.

VI. Material und angewandte Methoden.

Bei den untersuchten 28 Probanden handelte es sich um klinisch gesunde Erwachsene männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter von 20-35 Jahren. Den Probanden wurde durch Punktion der Vena cubitalis Blut entnommen und dies im Verhältnis 1:10 mit 3,8 % iger Natrium-citratlösung gemischt.

Ein Teil des Citratblutes wurde zur Herstellung eines Hämolysates aus gewaschenen Erythrocyten, ein weiterer Teil zur Herstellung eines Vollblut-hämolysates, ein dritter Teil zur Gewinnung von zellfreiem Plasma benötigt.

1. Aufbereitung des Blutes (Abbildung 2).

a) Herstellung eines Erythrocytenhämolysates zur Enzymbestimmung:

3 ml Citratblut wurde mit 2000U/min 5min zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Die Erythrocyten wurden dann dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in etwa 3ml phys. Kochsalzlösung suspendiert. Zu Hämolyse wurden 1ml Erythrocytensuspension mit 1ml Aqua dest., 0,7ml 0,05 mol Triäthanolaminpuffer (TRAP) und 0,3 ml einer gesättigten Digitoninlösung versetzt. Nach 15 min Stehen bei 4 Grad Celsius zur Cytolyse wurde das Zellstroma abzentrifugiert. Im abgeheberten Hämolysat wurden die Enzymaktivitäten bestimmt. Der Cytolyseansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 ml Erythrocytensuspension
1,0 ml Aqua dest.
0,7 ml TRAP (pH 7,5)
0,3 ml gesättigte Digitonin
lösung

b) Vollblut und Plasma wurden in gleicher Weise zum Test vorbereitet:

Vollblut:	1,0 ml Vollblut
	1,0 ml Aqua dest.
	0,7 ml TRAP (pH 7,5)
	0,3 ml ges. Digitonin- lösung
Plasma :	1,0 ml zellfreies Plasma
	1,0 ml Aqua dest.
	0,7 ml TRAP (pH 7,5)
	0,3 ml ges. Digitonon- lösung

Nach 15 min Stehen bei 4 Grad Celsius und Zentrifugieren (1x 15min mit 4000 U/min) wurden im Überstand die Enzymaktivitäten bestimmt.

Zellfreies Plasma wurde durch hochtouriges Zentrifugieren (2x 15min mit 4000 U/min) mit jeweiligem Verwerfen des Bodensatzes aus 3ml Citratblut gewonnen.

Die Erythrocytenzahl wurde im Vollblut und in der Erythrocytensuspension durch Kammerzählung (Neubauerkammer) bestimmt.

Der Hämatokrit (HK) wurde in der Erythrocytensuspension nach der von WINTROBE (48) angegebenen Methode ermittelt.

Das mittlere Einzelzellvolumen (MCV) der Erythrocyten wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MCV} = \frac{\text{HK (\%)} \cdot 10}{\text{Ery/mm}^3 \text{ in Mill}}$$

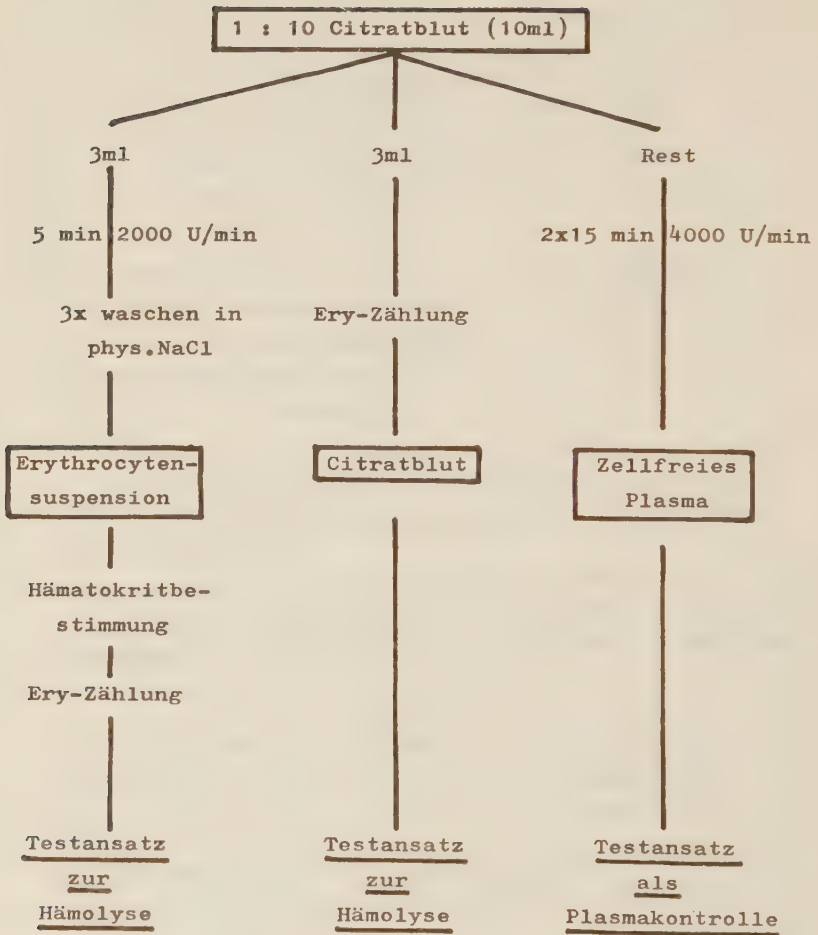


Abb. 2. Methodisches Vorgehen zur Gewinnung von Hämolylysaten aus Vollblut, gewaschenen Erythrocyten und Vorbereitung des Plasmakontrollansatzes.

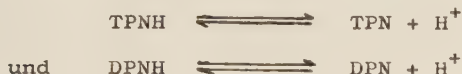
2. Bestimmung der Enzymaktivitäten.

Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch mit dem Gerät "Eppendorf" bei 366 my Wellenlänge in einem auf 25 Grad Celsius temperierten Küvettenhalter und einem pH- Wert von 7,5 gemessen.

Der optische Test wasserstoffübertragender Enzyme (BERGMEYER (2), BÜCHER et al. (6), WARBURG (46)) beruht auf der Messung der Lichtabsorption gelöster Pyridinnucleotide, die in enzymatischen Reaktionen als Cofermente mitwirken.

In solchen Reaktionen werden Pyridinnucleotide hydriert oder dehydriert und erhöhen oder vermindern die Absorption des monophasischen Lichtes.

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgt durch Feststellung der Umwandlungsgeschwindigkeit von



Es wurden jeweils nach einem Vorlauf "im fliegenden Start" Extinktionsänderungen von 0,025 oder 0,050 abgestoppt. Die Geschwindigkeit, in der eine bestimmte Extinktionsänderung (ΔE) durchlaufen wird, ist ein Maß für die Enzymaktivität, die in Internationalen Einheiten (I.E.) angegeben wird. Nach internationaler Übereinkunft entspricht 1 I.E. dem Umsatz von 1 mikroMol Substrat/min. bei einer Temperatur von 25 Grad Celsius. Die Änderung der Extinktion monochromatischen Lichtes von 366 my Wellenlänge dient als photometrische Grundlage.

Die Berechnung der Enzymaktivitäten leitet sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ab (BERGMEYER (3)).

Die Internationalen Einheiten können auch über die Ermittlung der Enzymaktivität in BÜCHER- Einheiten (BE) berechnet werden.

Dabei ist definitionsgemäß 1 BÜCHER- Einheit die in 1ml Ansatz vorhandene Enzymaktivität, welche bei 25 Grad Celsius, einer Schichtdicke von $d=10\text{mm}$, einer Wellenlänge von 366 my in 100 Sekunden eine Extinktionsänderung von 0,100 bei den DPN- und TPN- abhängigen Reaktionen bewirkt (BEISENHERZ et al.(1)). Dies entspricht einem Umsatz von 0,0303 mikroMol/ml, auf die Minute bezogen von 0,0182 mikroMol/ml. Demnach ergibt sich für die Berechnung der Enzymaktivitäten unter Berücksichtigung der Verdünnung des zum Ansatz verwandten Hämolsates (oder ähnlichem) folgende Formel:

$$\frac{\Delta E_{366} \cdot 60 \cdot V_{F1} \cdot V_F}{y \text{ sec} \cdot d \cdot 0,06 \cdot V_E} = x \text{ BE/ml}$$

- V_{F1} = Volumen des Küvetteninhalts des Testansatzes
 V_F = Verdünnungsfaktor bei der Hämolyse od. ähnl.
 ΔE_{366} = Extinktionsänderung bei 366 my
 $y \text{ sec}$ = Gestoppte Sekundenzahl
 d = Schichtdicke
 V_E = Volumen (ml) eingesetztes Hämolsat od. ähnl.
 BE/ml = BÜCHER- Einheiten/ml Ausgangsansatzes

Beispiel zur Berechnung der Pyruvatkinase:

Hämolsatmenge: 0,05 ml Testvolumen: 2,11 ml

Schichtdicke : 1,00 cm Extinktionsänderung: 0,050

$$\frac{0,05 \cdot 60 \cdot 2,11 \cdot 3}{\text{sec} \cdot 1 \cdot 0,06 \cdot 0,05} = \frac{6330}{\text{sec}} = \text{BE/ml}$$

Danach ergeben sich für die bestimmten Enzyme folgende Umrechnungsfaktoren (F):

$$F = \frac{\Delta E \cdot 60 \cdot V_{F1} \cdot V_F}{d \cdot 0,06 \cdot V_E}$$

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die einzelnen Umrechnungsfaktoren aufgeführt.

Enzym	Hämo- lysat, Plasma (ml)	Test- volumen (ml)	ΔE	Faktor
Hexokinase	0,10	3,01	0,025	2330
Aldolase	0,10	3,07	0,025	2310
GAPDH	0,05	3,13	0,050	9400
PGK	0,05	3,13	0,050	9400
PGM I	0,05	3,02	0,025	4650
PGM II	0,05	3,02	0,025	4575
Enolase	0,05	2,10	0,050	6300
PK	0,05	2,11	0,050	6330
LDH	0,02	2,10	0,050	15700
G-6-PDH	0,10	3,00	0,025	2260
6-PGDH	0,10	3,05	0,025	2290
GSR	0,10	3,10	0,025	2320

Tab.4. Umrechnungsfaktoren zur Ermittlung der intraerythrocytären Enzymaktivitäten, die sich aus der oben erwähnten Formel ableiten.

Die Umrechnung der Aktivitäten in Internationale Einheiten erfolgt unter der Berücksichtigung des Verhältnisses 1 I.E. = 55 BE (BERGMAYER (2)).

Der Fragestellung gemäß werden die Aktivitäten auf zwei Bezugssysteme bezogen:

1) Bezogen auf 10^{11} Zellen beträgt die

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= \frac{\text{BE} \cdot 10^{11}}{55 \cdot \text{Zellzahl/ml}} \\ &= \frac{\text{BE} \cdot 100}{55 \cdot \text{Zellzahl/ml in Mill.}} \\ &= \frac{\text{I.E.}}{10^{11} \text{ Zellen}}\end{aligned}$$

2) Bezogen auf 1 ml Erythrocyten beträgt die

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= \frac{\text{BE} \cdot 100}{55 \cdot \text{Hämatokrit in \%}} \\ &= \frac{\text{I.E.}}{1 \text{ ml Erythrocyten}}\end{aligned}$$

Bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten im Vollblut werden die störenden Plasmaaktivitäten nach folgendem Ansatz eliminiert ("Plasmasubtraktionsmethode", OHLER (34)):

$$\begin{aligned}&\text{Aktivität des Vollblutes} \\ &- \text{Aktivität des zellfreien Plasmas} \\ &= \text{Aktivität der Erythrocyten, Leukocyten} \\ &\quad \text{und Thrombocyten im Ansatz}\end{aligned}$$

$$\frac{F}{\text{sec(Vollblut)}} - \frac{F}{\text{sec(Plasma)}} = \frac{\text{Aktivität (BE)}}{\text{Vollblut-Plasma}}$$

$$\frac{\text{BE}}{55 \cdot \text{Zellen/mm}^3 \text{ in Mill.}} = \frac{\text{I.E.}}{10^{11} \text{ Erythrocyten(+Aktivitäten der Leukocyten und Thrombocyten)}}$$

Es wurden folgende Enzyme bestimmt:

Hexokinase (HK) nach GRIGNANI und LÖHR (12), Diphospho-fructosealdolase nach RACKER (36), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase nach DELBRÜCK, ZEBE und BÜCHER (9), Phosphoglyceromutase I und II nach LÖHR und WALLER (23), 3-Phosphoglycerat-1-Kinase nach VOGELL, BISHAY, BÜCHER et al. (43), Enolase nach BÜCHER (5), Pyruvatkinase nach BEISENHERZ et al. (1), Lactatdehydrogenase nach KUBOWITZ und OTT (20), Glukose-6-Phosphatdehydrogenase nach LÖHR und WALLER (25), 6-Phosphoglukonatdehydroge-nase nach HORECKER und SMYRNIOTIS (16), Glutathionreduk-tase nach RACKER (35).

VII. Ergebnisse.

Die in der Suspension gewaschener Erythrocyten der Untersuchungsgruppe ($n=18$) bestimmten Hämatokrite, Erythrocytenzahl/mm³ und die mittleren Einzelzellvolumina sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Es sind Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s_x) angegeben.

Die im Hämolysat gewaschener Erythrocyten bestimmten Aktivitäten der Enzyme

Hexokinase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, Diphosphofructosealdolase, Phosphoglyceromutase I und II, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, Glutathionreduktase, Phosphoglyceratkinase, Enolase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Aktivitäten sind in Internationalen Einheiten bezogen auf die Zellzahl (I.E./10¹¹ Erythrocyten) und bezogen auf das Zellvolumen (I.E./ml Erythrocyten) angegeben. In der Tabelle sind ferner die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Um festzustellen, ob zwischen der Zellzahl in der Erythrocytensuspension und dem mittleren Erythrocytenvolumen ein statistischer Zusammenhang besteht, wurde eine Regressionsgleichung und der Korrelationskoeffizient (r) berechnet (KOLLER (18)).¹⁾ Das Vorhandensein einer Beziehung zwischen Erythrocytenvolumen und Erythrocytenzahl konnte statistisch gesichert werden (Abbildung 3).

Weitere Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten wurden berechnet, um zu prüfen, ob schon bei Gesunden eine Beziehung zwischen der Höhe der auf die Zellzahl bezogenen Enzymaktivitäten und dem mittleren Volumen der Einzelzelle besteht und inwieweit

1) s.S.18

diese vermutete Beziehung sich ändert, wenn die Enzymaktivitäten auf das Zellvolumen bezogen werden.

Die Abbildungen 4 bis 7 zeigen die Enzymaktivitäten der Phosphoglyceratkinase (Abb.4), der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (Abb.5), der Pyruvatkinase (Abb.6) und der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (Abb.7) in I.E./10¹¹ Erythrocyten in Abhängigkeit vom mittleren Einzelzellvolumen (MCV).

Die Abbildungen 4a bis 7a zeigen die Aktivitäten dieser Enzyme in I.E./ ml Erythrocyten in Abhängigkeit vom mittleren Einzelzellvolumen.

Für keines der beiden Bezugssysteme, die der Berechnung der Enzymaktivitäten zugrunde gelegt wurden, konnte eine Abhängigkeit vom MCV statistisch gesichert werden.

-
- 1) Der Korrelationskoeffizient r , der zwischen -1 und $+1$ liegt und bei Unabhängigkeit 0 wird, mißt die Strammheit des Zusammenhangs einer linearen Beziehung. Es ist

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Die sogenannte Regressionslinie gibt an, welche y -Werte durchschnittlich zu den x -Werten gehören. Man schließt dabei von x auf y . Die Gleichung ist

$$y_R = a + bx$$

wobei der "Regressionskoeffizient" b

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

und $a = \bar{y} - b\bar{x}$

	Hämatokrit(%)	Ery/mm ³ (Mill.)	MCV(in my ³)
1	26,0	2,73	95,2
2	28,0	2,98	94,0
3	27,0	2,81	96,1
4	26,0	2,96	87,8
5	27,0	3,00	93,0
6	27,0	2,88	93,7
7	28,0	3,00	93,3
8	27,5	2,73	101,0
9	24,5	2,63	93,2
10	23,5	2,43	96,7
11	24,0	2,32	103,4
12	25,8	2,72	95,0
13	25,5	2,70	94,4
14	26,0	2,60	100,0
15	26,3	2,70	97,4
16	25,0	2,47	101,2
17	25,0	2,77	90,2
18	26,2	2,73	95,9
$\bar{x}$	26,02	2,72	95,7
s_x	1,29	0,19	3,9

Tab.5. Hämatokrit, Erythrocyten/mm³ in der Suspension und mittlere Einzelzellvolumina, deren Mittelwerte und Standardabweichungen von 18 klinisch gesunden Erwachsenen.

Enzym	I.E./10 ¹¹ Ery.		I.E./ml Ery	
	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
Hexokinase	1,9	0,3	0,20	0,02
1,6-Diphosphofruc- tosealdolase	8,5	0,8	0,89	0,08
Glycerinaldehyd-3- phosphatdehydrogenase	253,0	34,0	26,5	3,7
Phosphoglyceromutase I	9,5	1,9	0,99	0,19
Phosphoglyceromutase II	52,2	4,0	5,5	0,44
3-Phosphoglycerat-1- kinase	331,0	21,0	34,5	2,3
Enolase	17,1	2,2	1,9	0,23
Pyruvatkinase	37,0	5,1	3,9	0,5
Lactatdehydrogenase	285,0	39,0	29,3	4,1
Glukose-6-Phosphat- dehydrogenase	17,6	2,0	1,8	0,18
6-Phosphoglukonat- dehydrogenase	11,5	1,4	1,2	0,15
Glutathionreduktase	7,7	1,7	0,8	0,18

Tab.6. Intraerythrocytäre Enzyme des Kohlehydratstoff-
wechsels bei klinisch gesunden Erwachsenen (n=18), ge-
messen im Hämolysat gewaschener Erythrocyten. Die Akti-
vitäten sind in Internationalen Einheiten 1. pro 10¹¹
Erythrocyten, 2. pro ml Erythrocyten angegeben.

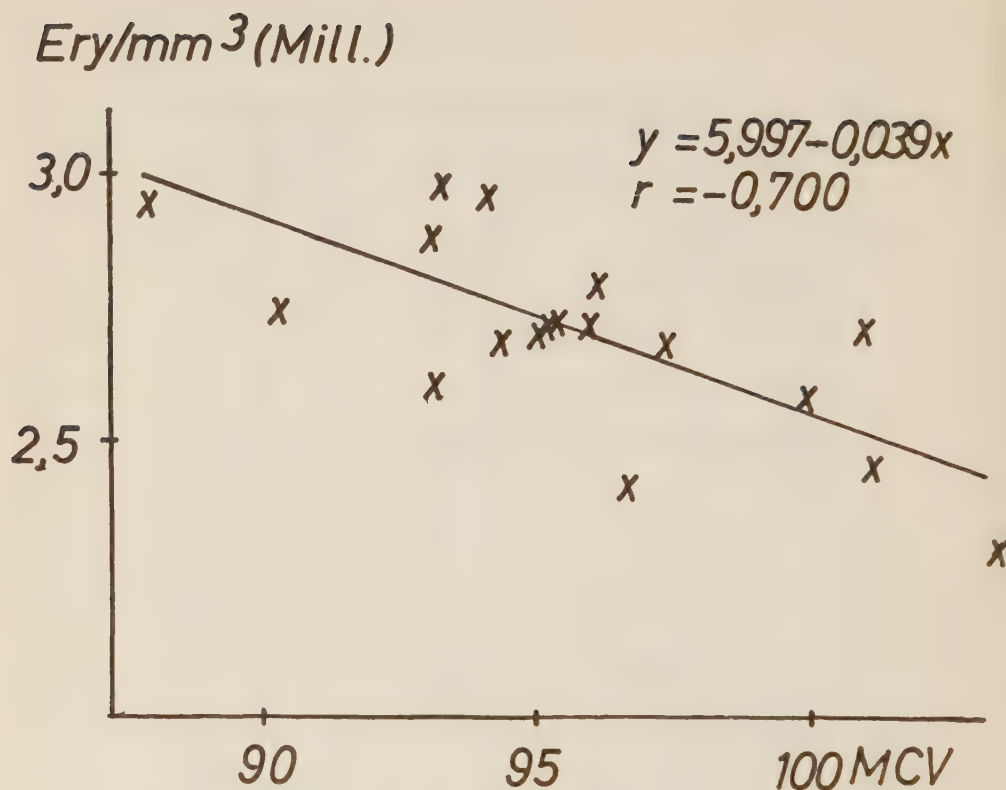


Abb.3. Erythrocytenzahl pro mm³
in Abhängigkeit vom mittleren Ery-
throcytenvolumen (MCV) in μm^3 .

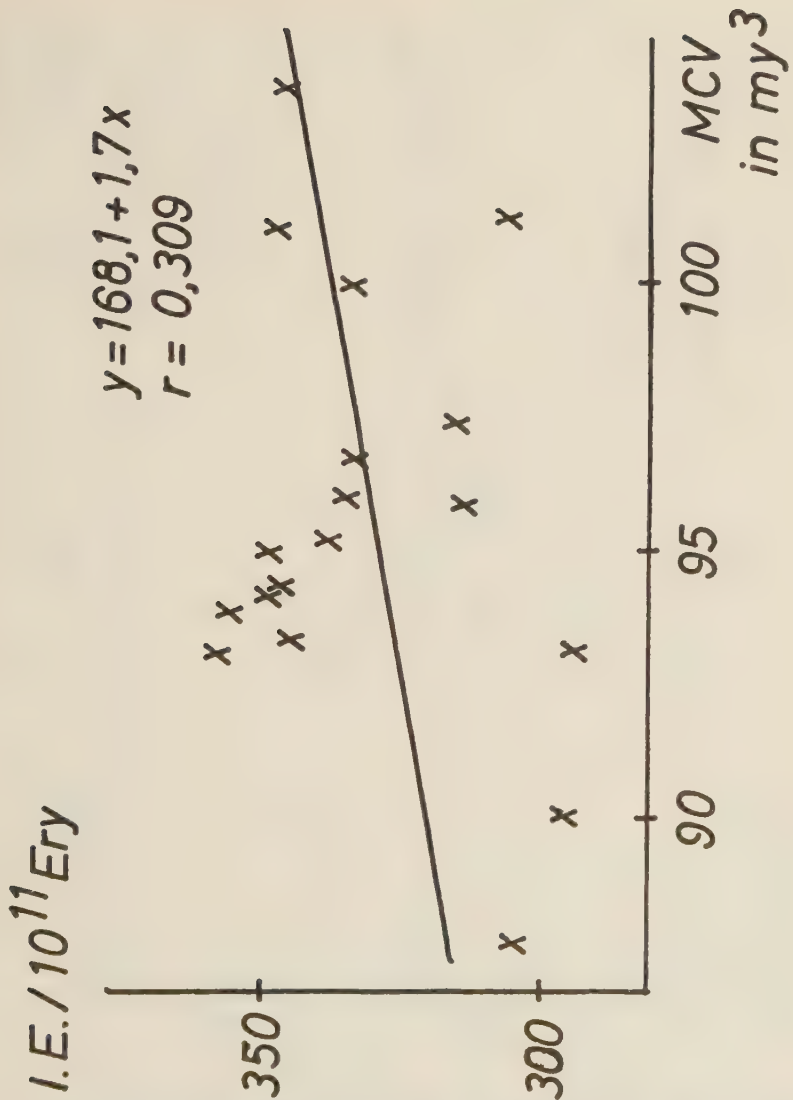


Abb. 4. Aktivität der PGK in I. E. bezogen auf Zellzahl in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytenvolumen (MCV).

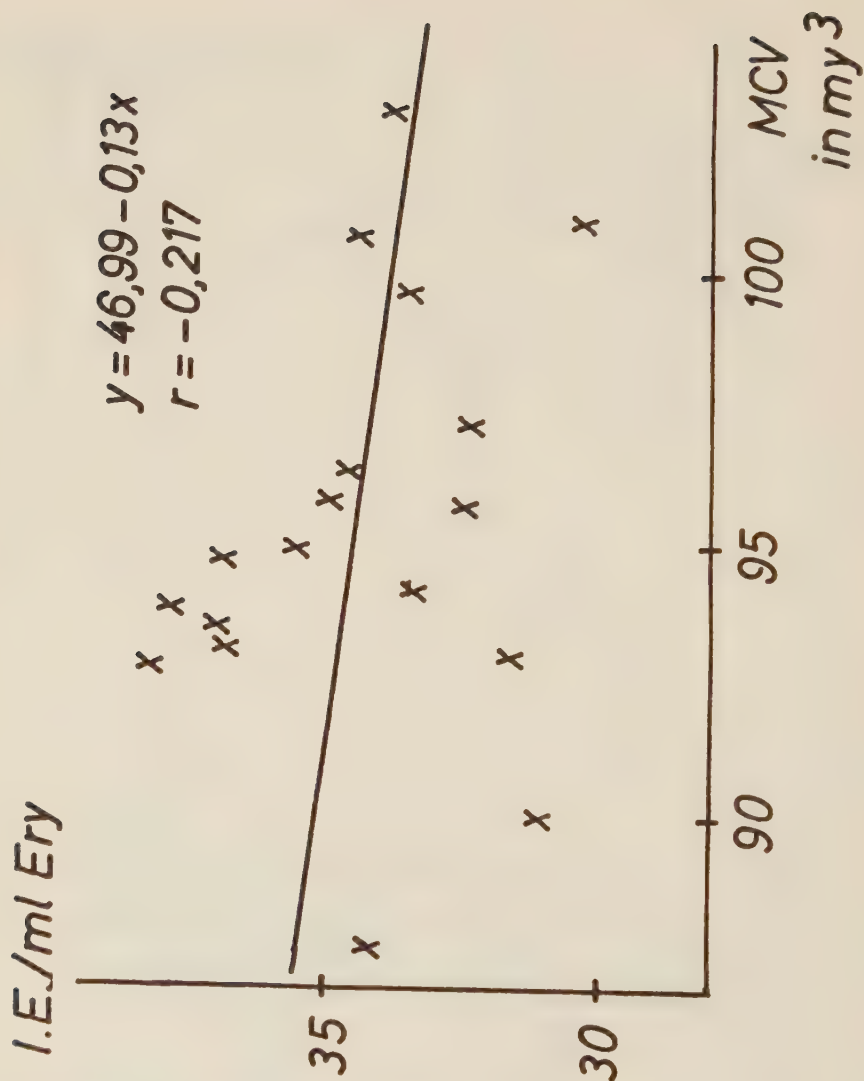


Abb. 4a. Aktivität der PGK in I.E. bezogen auf Zellvolumen in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytenvolumen (MCV).

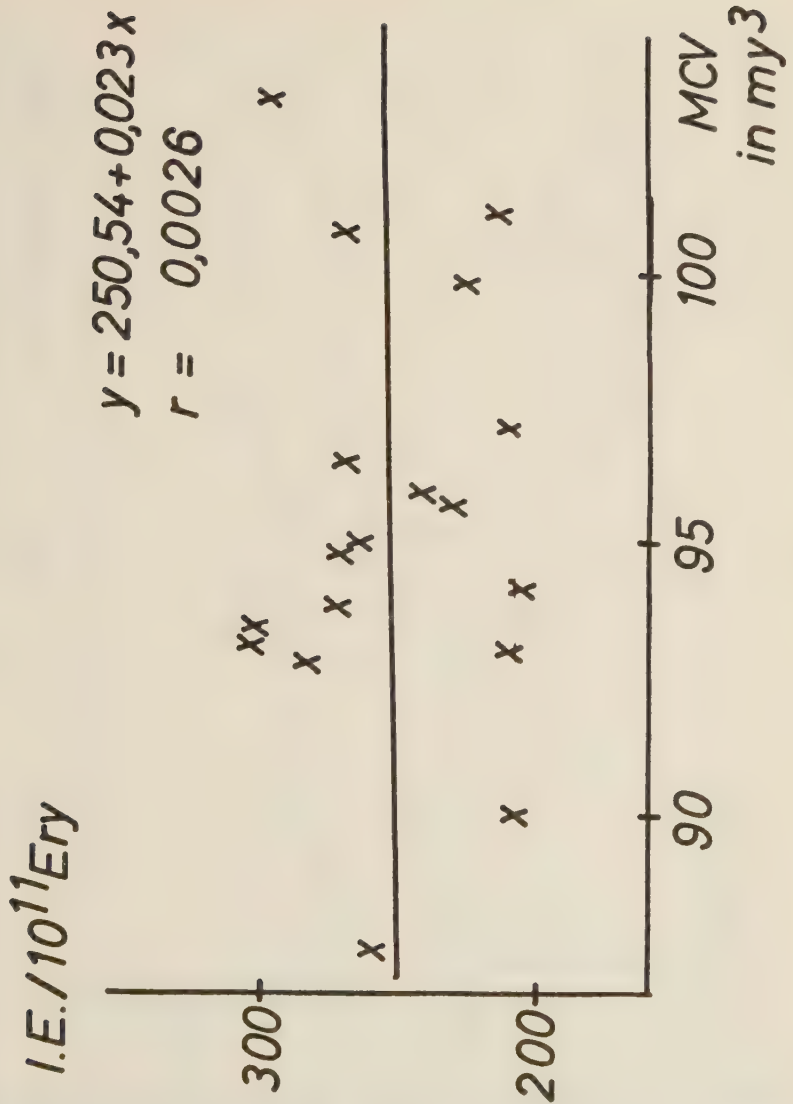


Abb. 5. Aktivität der GAPDH in I.E. bezogen auf Zellzahl in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytenvolumen (MCV).

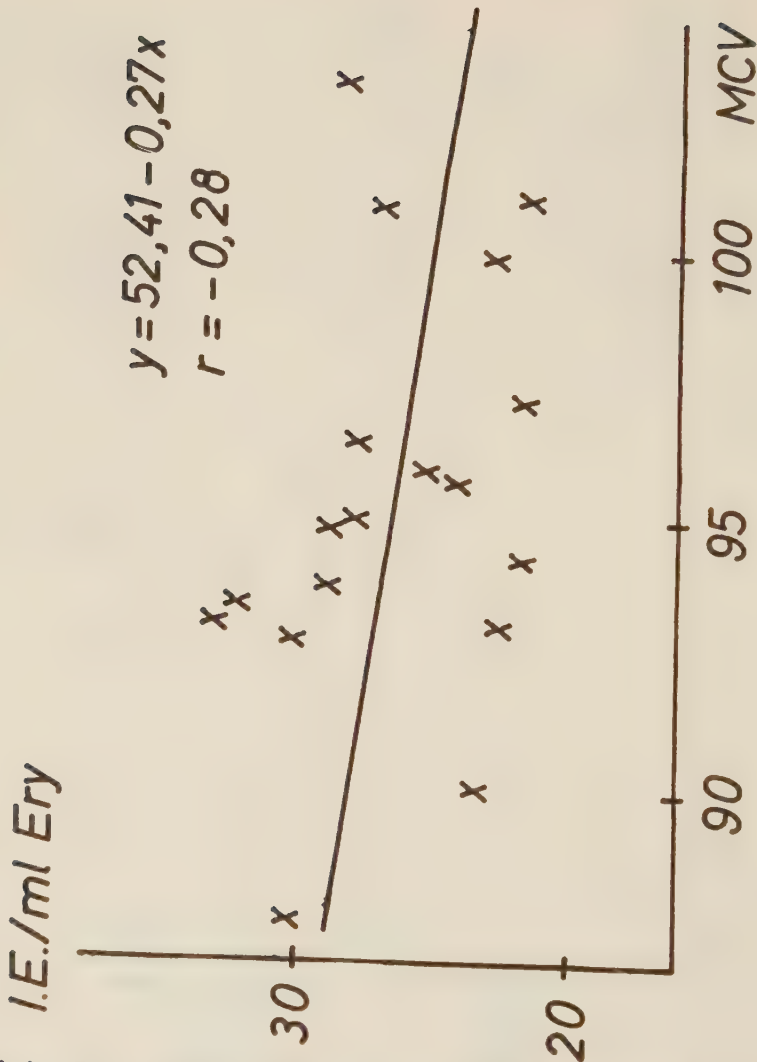


Abb. 5a. Aktivität der GAPDH in I.E. bezogen auf Zellvolumen in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytenvolumen (MCV).

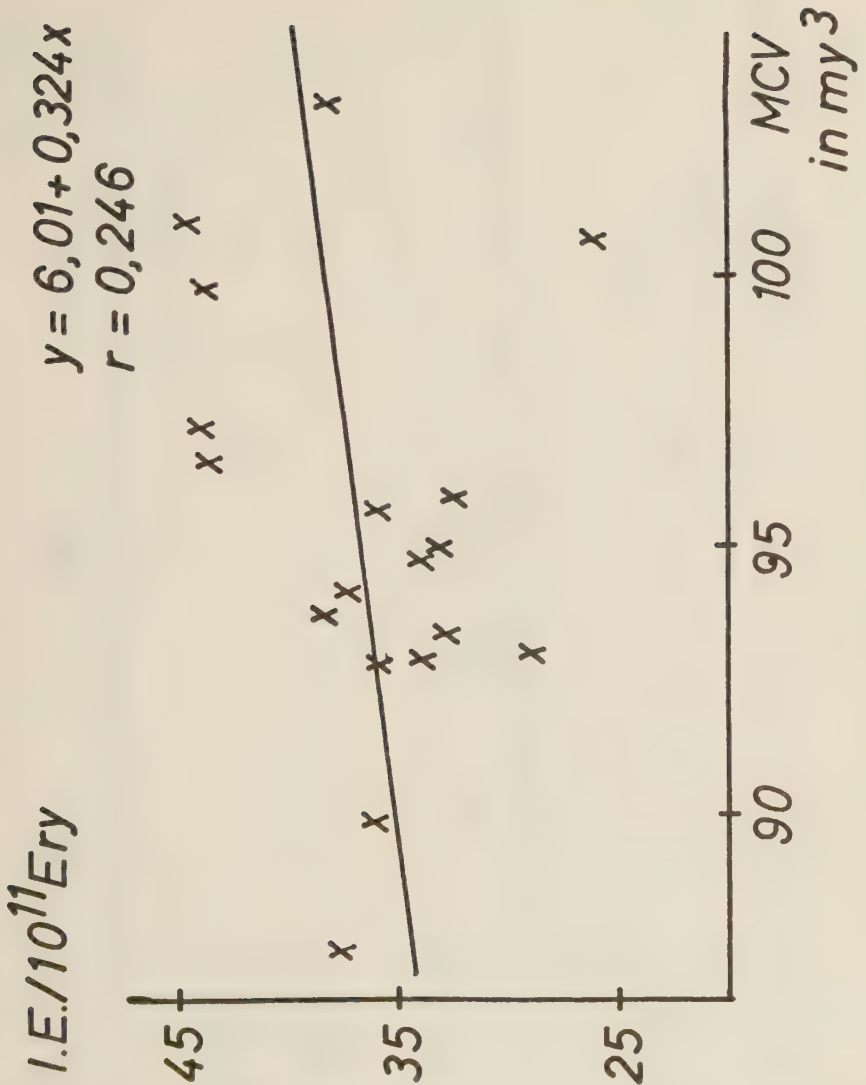


Abb. 6. Aktivität der PK in I.E. bezogen auf Zellzahl in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytenvolumen (MCV).

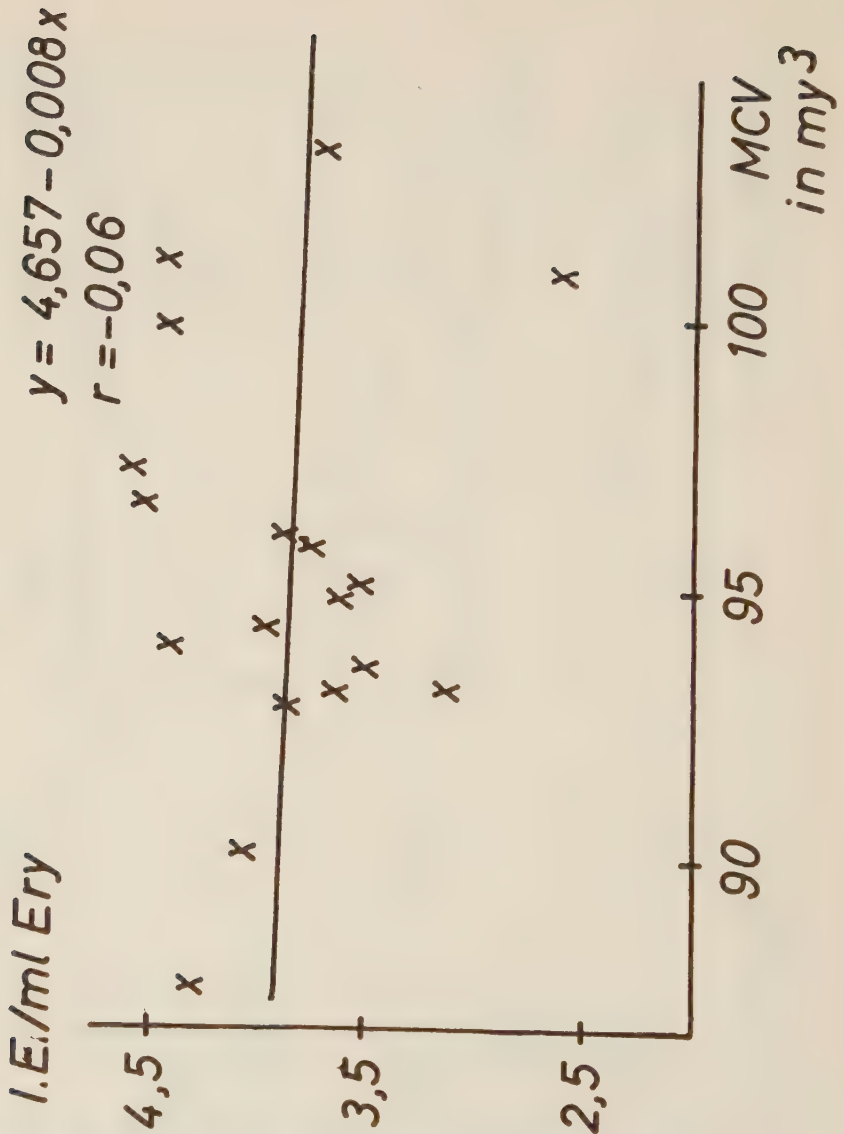


Abb. 6a. Aktivität der PK in I.E. bezogen auf Zellvolumen in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytevolumen (MCV).

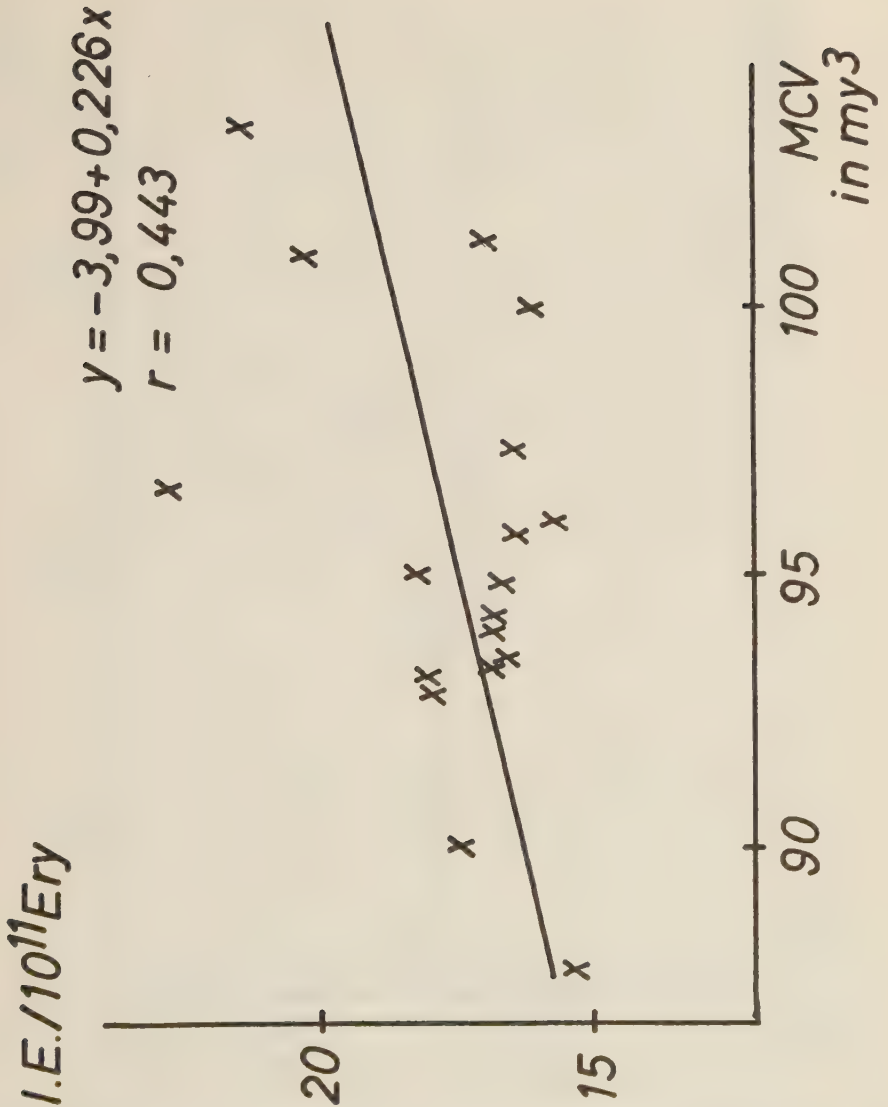


Abb. 7. Aktivität der G-6-PDH in I.E. bezogen auf Zellzahl in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytevolumen (MCV).

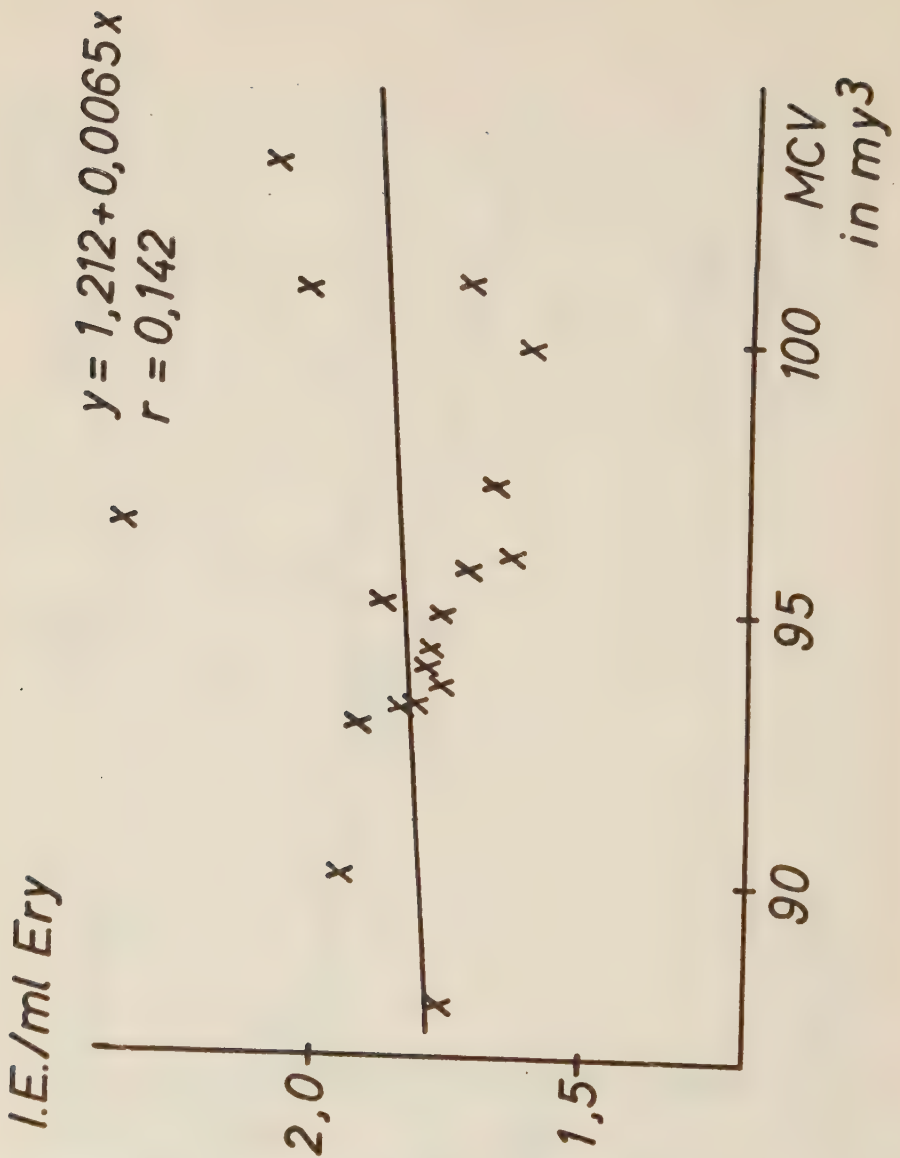


Abb. 7a. Aktivität der G-6-PDH in I.E. bezogen auf Zellvolumen in Abhängigkeit vom mittleren Erythrocytenvolumen (MCV).

Durch jeweilige Parallelbestimmung wurden im Vollblut, in gewaschenen Erythrocyten und im zellfreien Plasma von 10 klinisch gesunden Erwachsenen die Aktivitäten der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, der Phosphoglyceratkinase, der Lactatdehydrogenase und der Pyruvatkinase ermittelt.

In den Spalten 1, 2 und 3 der Tabellen 7 bis 10 sind die im Vollblut (VB), in gewaschenen Erythrocyten (Ery.gew.) bestimmten und die durch Abzug der Plasmaaktivitäten von den Vollblutaktivitäten ("Plasmasubtraktionsmethode") errechneten Aktivitäten (VB-P) der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (Tab.7), der Phosphoglyceratkinase (Tab.8), der Lactatdehydrogenase (Tab.9) und der Pyruvatkinase (Tab.10) zusammengefaßt. Die Enzymaktivitäten sind in I.E./10¹¹ Erythrocyten angegeben. Den Tabellen sind ferner Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s_x) zu entnehmen.

Zur Prüfung, ob die mit unterschiedlicher Technik ermittelten Enzymaktivitäten miteinander vereinbar sind oder ob Plasmaaktivitäten, Aktivitäten der Leukocyten und Thrombocyten und mechanische Einflüsse beim Waschvorgang einen statistisch nachweisbaren Einfluß auf die Höhe der ermittelten Enzymaktivitäten haben, wurden die Meßreihen mit Hilfe des T-Tests für verbundene Reihen miteinander verglichen (SACHS (32)).

In den Spalten 4, 5 und 6 der Tabellen 7 bis 10 sind die Einzeldifferenzen (d_1) der verbundenen Meßreihen VB und VB-P (Spalte 4), VB und Ery.gew. (Spalte 5) und VB-P und Ery.gew. (Spalte 6) sowie deren Mittelwerte ($\bar{d}$) aufgeführt. Ferner sind den Tabellen die Quotienten T zu entnehmen.

Dabei lagen die im Vollblut bestimmten Aktivitäten signifikant (d.h. zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit $\approx 1\%$) höher als die Aktivitäten, die durch

die Plasmasubtraktionsmethode ermittelt wurden (Tab. 7-10, Spalten 1,2 u.4).

Der statistische Vergleich der im Vollblut und der nach der Plasmasubtraktionsmethode ermittelten Enzymaktivitäten mit den in gewaschenen Erythrocyten bestimmten ergab für die Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase und Lactatdehydrogenase keine signifikanten Unterschiede (Tab. 7-9, Spalten 5 u.6).

Die Aktivitäten der Pyruvatkinase lagen in gewaschenen Erythrocyten signifikant unter den im Vollblut und nach der Plasmasubtraktionsmethode bestimmten Aktivitäten (Tab. 10, Spalten 5 u.6).

	VB	VB-P	Ery. gew.	(1)-(2)	(1)-(3)	(2)-(3)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	231	228	232	+3	- 1	-4
2	289	286	263	+3	+26	+23
3	294	290	314	+4	-20	-24
4	278	276	270	+2	+ 8	+ 6
5	298	296	285	+2	+13	+11
6	242	239	280	+3	-38	-41
7	370	365	426	+5	-56	-61
8	276	274	286	+2	-10	-12
9	243	241	325	+2	-82	-84
10	246	245	294	+1	-48	-49
n	10	10	10	10	10	10
$\bar{x}$ 1)	277	274	298			
s_x 2)	39	38	49			
$\bar{d}$ 3)				2,7	-20,8	-23,5
$s_{\bar{d}}$ 4)				0,37	10,89	10,93
T 5)				7,37	- 1,91	- 2,15
Sig- nif.				ja	nein	nein

Tab.7. Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase:
Einzelergebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen
der Enzymaktivitäten im Vollblut(VB), nach der Plasma-
subtraktionsmethode errechnet(VB-P) und in gewaschenen
Erythrocyten(Ery.gew.) in I.E./ 10^{11} Erythrocyten. Es sind
die Einzeldifferenzen der verbundenen Reihen und die im
T-Test für verbundene Stichproben ermittelten Quotienten T
aufgeführt.

$$\begin{array}{ll}
 1) \bar{x} = \frac{1}{10} \sum x_i & 4) s_{\bar{d}} = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{10 \cdot 9}} \\
 2) s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{9}} & 5) T = \bar{d} / s_{\bar{d}} \\
 3) \bar{d} = \frac{1}{10} \sum d_i &
 \end{array}$$

	VB	VB-P	Ery. gew.	(1)-(2)	(1)-(3)	(2)-(3)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	346	340	319	+6	+27	+21
2	420	414	405	+6	+15	+ 9
3	372	367	452	+5	-80	-85
4	356	353	320	+3	+36	+33
5	416	415	475	+1	-59	-60
6	361	359	381	+2	-20	-22
7	472	467	470	+5	+ 2	- 3
8	353	350	357	+3	- 4	- 7
9	355	352	432	+3	-77	-80
10	388	387	346	+1	+42	+41
n	10	10	10	10	10	10
$\bar{x}$ 1)	384	380	396			
s 2)	38	38	57			
$\bar{d}$ 3)						
s 4)				3,50	-11,8	-15,3
$\bar{d}$ 5)				0,60	45,77	45,61
T				5,83	- 0,82	- 1,06
Sig- nif.				ja	nein	nein

Tab.8. Phosphoglyceratkinase:

Einzelerggebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivitäten im Vollblut(VB), nach der Plasma-subtraktionsmethode errechnet(VB-P) und in gewaschenen Erythrocyten(Ery.gew.) in I.E./ 10^{11} Erythrocyten. Es sind die Einzeldifferenzen der verbundenen Reihen und die im T-Test für verbundene Stichproben ermittelten Quotienten T aufgeführt.

1)2)3)4)5) s.s.32

	VB	VB-P	Ery. gew.	(1)-(2)	(1)-(3)	(2)-(3)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	376	366	393	+10	-17	-27
2	336	320	329	+16	+ 7	- 9
3	311	296	316	+15	- 5	-20
4	304	296	300	+ 8	+ 4	- 4
5	349	340	329	+ 9	+20	+11
6	262	256	284	+ 6	-22	-28
7	412	408	395	+ 4	+17	+13
8	308	303	320	+ 5	-12	-17
9	328	317	331	+11	- 3	-13
10	295	292	246	+ 3	+49	+46
n	10	10	10	10	10	10
$\bar{x}$ 1)	328	319	324			
s_x 2)	41	41	43			
$\bar{d}$ 3)				8,70	3,80	-4,90
$s_{\bar{d}}$ 4)				1,40	6,64	7,20
T 5)				6,22	0,57	-0,68
Sig-nif.				ja	nein	nein

Tab.9. Lactatdehydrogenase:

Einzelergebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivitäten im Vollblut(VB), nach der Plasmasubtraktionsmethode(VB-P) errechnet und in gewaschenen Erythrocyten(Ery.gew.) in I.E./ 10^{11} Erythrocyten. Es sind die Einzeldifferenzen der verbundenen Reihen und die im T-Test für verbundene Stichproben ermittelten Quotienten T aufgeführt.

	VB	VB-P	Ery. gew.	(1)-(2)	(1)-(3)	(2)-(3)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	41,2	39,5	27,8	+1,7	+13,4	+11,7
2	52,0	50,9	32,5	+1,1	+19,4	+18,4
3	33,1	32,0	27,5	+1,1	+ 5,6	+ 4,5
4	39,2	37,9	34,7	+1,3	+ 4,5	+ 3,2
5	43,0	42,1	31,3	+0,9	+11,7	+10,8
6	37,6	36,5	29,6	+1,1	+ 8,0	+ 6,9
7	34,0	32,1	25,8	+1,9	+ 8,2	+ 6,3
8	31,8	30,5	21,5	+1,3	+10,3	+ 9,0
9	43,5	42,8	40,0	+0,7	+ 3,5	+ 2,8
10	41,9	41,1	37,5	+0,8	+ 4,4	+ 3,6
n	10	10	10	10	10	10
$\bar{x}$ 1)	39,7	38,5	30,8			
$\bar{a}$ 2)	5,7	5,9	5,3			
$\bar{d}$ 3)				1,19	8,91	7,72
$s_{\bar{d}}$ 4)				0,12	1,58	1,55
T 5)				9,95	5,66	4,99
Sig-nif.				ja	ja	ja

Tab.10. Pyruvatkinase:

Einzelerggebnisse, Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivitäten im Vollblut(VB), nach der Plasma-subtraktionsmethode errechnet(VB-P) und in gewaschenen Erythrocyten(Ery.gew.) in I.E./ 10^{11} Erythrocyten. Es sind die Einzeldifferenzen der verbundenen Reihen und die im T-Test für verbundene Stichproben ermittelten Quotienten T aufgeführt.

In Tabelle 11 sind die im zellfreien Plasma bestimmten Enzymaktivitäten der Lactatdehydrogenase, der Pyruvatkinase, der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und der Phosphoglyceratkinase zusammengefaßt.

	LDH	PK	GAPDH	PGK
1	0,310	0,069	0,088	0,170
2	0,550	0,040	0,056	0,225
3	0,530	0,050	0,049	0,221
4	0,260	0,052	0,063	0,139
5	0,335	0,046	0,079	0,110
6	0,294	0,039	0,061	0,117
7	0,164	0,070	0,136	0,166
8	0,238	0,061	0,114	0,216
9	0,460	0,036	0,127	0,114
10	0,176	0,030	0,114	0,140
n	10	10	10	10
$\bar{x}$ 1)	0,332	0,049	0,089	0,162
s_x 2)	0,131	0,010	0,030	0,042

Tab.11. Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen der Aktivitäten der LDH, PK, GAPDH und PGK im zellfreien Plasma in I.E./ml von zehn klinisch gesunden Erwachsenen.

1)2) s.S. 32

VIII. Diskussion der Ergebnisse

LÖHR und WALLER (22) hatten gezeigt, daß bei hämatologischen Erkrankungen, die sehr große Erythrocyten aufweisen (z.B. bei der perniziösen Anämie) für die intraerythrocytären Enzyme erhöhte Aktivitäten berechnet werden, wenn als Bezugssystem die Erythrocytenzahl zugrunde gelegt wird. Wenn als Parameter für die Umrechnung der gemessenen Aktivitäten in Internationale Einheiten das Zellvolumen herangezogen wird, finden sich Enzymaktivitäten, die im Normalbereich liegen. Das widerspricht nicht der Tatsache, daß nach therapeutischer Beeinflussung einer perniziösen Anämie sich die auf Zellzahl bezogenen Aktivitäten "normalisieren", da sich als Zeichen einer Ausheilung auch die Zellvolumina vermindern. Bei der perniziösen Anämie finden wir im peripheren Blut große Erythrocyten (Megalocyten) und niedrige Erythrocytenzahlen. Es besteht ein beschleunigter Erythrocytenabbau ohne Reticulocytenvermehrung. Bei der intraerythrocytären Enzymbestimmung erhalten wir nun rein rechnerisch (geringe Zellzahl, hohe gemessene Aktivität) bei Umrechnung der Aktivitäten in $I.E./10^{11}$ Erythrocyten ohne Berücksichtigung des unverhältnismäßig großen Zellvolumens sehr hohe Enzymaktivitäten, die als Erhöhung des intracellulären Stoffwechsels gedeutet werden können, während diese "erhöhten Aktivitäten" nur Ausdruck normaler Aktivitäten großer Zellen sind. Hier zeigt sich die Problematik und Bedeutung, die die Wahl des Bezugssystem, welches der Berechnung der Enzymaktivitäten zugrunde gelegt wird, beinhaltet.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob schon im Bereich der physiologischen Schwankungsbreite der mittleren Erythrocytenvolumina der Wahl des Bezugssystems (Zellzahl oder Zellvolumen) für die Berechnung der intraerythrocytären Enzymak-

tivitäten eine Bedeutung zukommt. Es fand sich zunächst eine statistisch signifikante lineare Abhängigkeit der Erythrocytenzahl/mm³ vom mittleren Einzelzellvolumen (Abb.3). Mit zunehmendem mittleren Einzelzellvolumen nimmt die Erythrocytenzahl/mm³ ab. Unter der Annahme, daß große Erythrocyten höhere Enzymaktivitäten haben als kleine, ließ sich schon an dieser Stelle eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Wahl der Zellzahl als Parameter für die Aktivitätsberechnung vermuten.

Zur Klärung der Frage, ob schon im Bereich der physiologischen Schwankungsbreite der mittleren Erythrocytenvolumina vom Bezugssystem, welches der Berechnung der Enzymaktivitäten zugrunde gelegt wird, abhängige Aktivitätsunterschiede auftreten, wurden 1. die auf die Zellzahl bezogenen Aktivitäten (I.E./10¹¹ Ery) (Abb.4-7) und 2. die auf Zellvolumen bezogenen Aktivitäten (I.E./ml Ery) (Abb.4a-7a), die im HämolySAT gewaschener Erythrocyten bestimmt wurden, gegen das mittlere Zellvolumen aufgetragen. Dabei fiel bei allen Enzymen eine Zunahme der Aktivität mit steigendem mittleren Zellvolumen auf, wenn die Zellzahl für die Aktivitätsberechnung zugrunde gelegt wurde. Wenn die Aktivitäten auf das Zellvolumen bezogen wurden, war eher eine Aktivitätsabnahme mit steigendem mittleren Zellvolumen zu erkennen. Diese Befunde konnten allerdings statistisch nicht gesichert werden.

Dem zweiten Teil der Arbeit lag die Fragestellung zugrunde, ob bei klinisch gesunden Versuchspersonen im Plasma vorhandene endogene Substrate und in anderen Blutzellen (Leukocyten, Thrombocyten) vorhandene Enzymaktivitäten einen Einfluß auf die Höhe der mit verschiedenen Techniken (Abb.2) ermittelten intraerythrocytären Enzymaktivitäten haben. Zur Klärung dieser Frage wurden die Enzymaktivitäten auf übliche Weise in gewaschenen und in physiologischer Kochsalzlösung

suspendierten Erythrocyten bestimmt. Dabei tauchte die Frage auf, ob nicht schon durch den Waschvorgang und durch die Cytolyse in Kochsalzlösung Veränderung der Enzymaktivitäten eintreten. Um diese Frage beantworten zu können, wurden ferner die Enzymaktivitäten im Vollblut und im durch hochtouriges Abzentrifugieren gewonnenen zellfreien Plasma bestimmt. Diesem Vorgehen lag die Annahme zugrunde, daß nach Subtraktion der Plasmaaktivitäten von den Vollblutaktivitäten sich Enzymaktivitäten errechneten, die den in gewaschenen Erythrocyten bestimmten entsprächen oder sich von diesen dahingehend unterschieden, daß aus den Differenzen auf die Aktivitäten der im Vollblut vorhandenen Leukocyten und Thrombocyten geschlossen werden könne. Die Messung der Aktivitäten im Vollblut hat den Vorteil, daß die Zellen nicht durch Waschung vorgeschädigt werden, ehe sie zur Aktivitätsbestimmung lysiert werden, und daß die Zellen bis zur Cytolyse im physiologischen Milieu (Plasma) verbleiben.

Es stellte sich heraus, daß die Plasmaaktivitäten der bestimmten Enzyme (LDH, PGK, GAPDH, PK) im Verhältnis zu der intraerythrocytären Aktivität dieser Enzyme außerordentlich niedrig lagen (Tab.11) und für klinische Belange zwischen den im Vollblut gemessenen Aktivitäten und den durch Abzug der Plasmaaktivitäten von den Vollblutaktivitäten errechneten Aktivitäten kein Unterschied besteht. Dies steht mit der Tatsache in Einklang, daß es sich bei den bestimmten Enzymen um ubiquitäre, d.h. in jeder Zelle vorhandene, und im Normalfall um streng intracelluläre Enzyme handelt. Beim Gesunden mit normalem Erythrocytenumsatz sind die im Plasma gemessenen Aktivitäten dieser Enzyme entsprechend niedrig. Der statistische Vergleich der beiden Ergebnisreihen (VB und VB-P) ergab für VB-P signifikant niedrigere Werte.

Zwischen den im Vollblut und den in gewaschenen Erythrocyten gemessenen Enzymaktivitäten der GAPDH, der LDH und der PGK ließ sich im statistischen Vergleich kein signifikanter Unterschied nachweisen, obwohl für die GAPDH und die PGK die Mittelwerte der Enzymaktivitäten der gewaschenen Erythrocyten höher lagen als die der Vollblutaktivitäten. Als Ursache dafür sind die ganz erheblichen Einzeldifferenzen der verglichenen Meßreihen und die daraus resultierende hohe Standardabweichung der Einzeldifferenzen von der mittleren Differenz, sowie die hohen Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen zu nennen. (Tab.7-9, Spalten 5 u.6).

Die Aktivität der Pyruvatkinase lag in gewaschenen Erythrocyten statistisch signifikant unter der Vollblutaktivität dieses Enzyms. Es lag nahe, die Ursache dieser Differenz in einer im Vergleich zu anderen Enzymen höheren Plasmaaktivität der PK zu suchen. Bei Bestimmung der PK im zellfreien Plasma stellte sich jedoch heraus, daß deren Plasmaaktivität in Bereichen lag, die die Aktivitätsdifferenz zwischen Vollblut und gewaschenen Erythrocyten nicht erklären können (Tab.11, Spalte2).

Die Betrachtung der Mittelwerte der gemessenen Enzyme ließ also mit Ausnahme der Pyruvatkinase keine Unterschiede zwischen im Vollblut und in gewaschenen Erythrocyten bestimmten Enzymen erkennen. Beim Vergleich der Einzelergebnisse fielen jedoch zum Teil erhebliche Aktivitätsdifferenzen auf. Diese Differenzen, die allerdings für klinische Belange ohne Bedeutung sind, sind möglicherweise ein Hinweis, daß die intraerythrocytären Enzyme bei Waschung unterschiedlichen Einflüssen (z.B. mechanisch-technische Traumatisation) unterliegen. Als Ursache für diese Differenzen kommen im Vollblut vorhandene Enzymaktivitäten anderer Blutzellen nicht infrage, da dadurch die in gewaschenen

Erythrocyten gefundenen Aktivitäten, die über denen des Vollblutes lagen, nicht erklärt würden.

Die Ergebnisse lassen insgesamt den Schluß zu, daß Plasmaaktivitäten und die Aktivitäten der Leukocyten, Thrombocyten und im Plasma vorhandene endogene Substrate auf die mit unterschiedlicher Technik ermittelten intraerythrocytären Enzymaktivitäten zumindest für klinische Zwecke keinen wesentlichen Einfluß haben.

IX. Zusammenfassung

1. Im Hämolysat gewaschener Erythrocyten von 18 klinisch gesunden Erwachsenen wurden die Aktivitäten von zwölf intraerythrocytären Enzymen bestimmt und unter Zugrundelegung von a) der Zellzahl und b) dem Zellvolumen in Internationalen Einheiten (I.E./ml Erythrocyten und I.E./10¹¹ Erythrocyten) angegeben.
2. Beim Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Enzyme ergaben sich keine Unterschiede für beide Bezugssysteme. An vier Enzymen konnte unter Berücksichtigung der Einzelwerte gezeigt werden, daß schon bei gesunden Erwachsenen vom Bezugssystem abhängige, geringe Aktivitätsunterschiede auftreten können. Diese ließen sich allerdings statistisch nicht sichern.
3. Im Vollbluthämolysat, im Hämolysat gewaschener Erythrocyten und im zellfreien Plasma von zehn klinisch gesunden Erwachsenen wurden vier Enzyme des intraerythrocytären Kohlehydratstoffwechsels bestimmt. Mit Hilfe des T-Tests für verbundene Reihen wurden die im Vollblut, in gewaschenen Erythrocyten und die durch Subtraktion der Plasmaaktivitäten von den Vollblutaktivitäten ermittelten Enzymaktivitäten miteinander verglichen.
Es stellte sich heraus, daß es für klinische Belange bedeutungslos ist, ob die Bestimmungen der intraerythrocytären Enzyme im Vollblut, in gewaschenen Erythrocyten oder nach der Plasmasubtraktionsmethode durchgeführt werden, wenn man von den Ergebnissen der Pyruvatkinasebestimmung absieht.

X. Literaturverzeichnis

1. BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK
K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDET, G. PFLEIDERER:
Diphospho-Fructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-
dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-
phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Ka-
ninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Natur-
forsch. 8b, 555 (1953).
2. BERGMAYER, H.U.: Experimentelles. In: Methoden der
enzymatischen Analyse. Herausgeber: H.U. BERGMAYER.
S. 14. Weinheim a.d. Bergstraße 1962.
3. BERGMAYER, H.U.: Grundlagen der enzymatischen Analy-
se. In: Methoden der enzymatischen Analyse. Heraus-
geber: H.U. BERGMAYER. S. 3. Weinheim a.d. Bergstra-
ße 1962.
4. BOCK, H.E., O. KARGES, G.W. LÖHR, H.D. WALLER:
Fermenteigenschaft roter Blutzellen bei Lebererkrank-
ungen. Klin. Wschr. 36, 56 (1958).
5. BÜCHER, Th.: Phosphoglyceratekinase from Brewer's
yeast. In: Methods in enzymology I, p. 415, edit.
S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN. New York: Acad. Press
1955.
6. BÜCHER, Th., W. LUH, D. PETTE: Einfache und zusammen-
gesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden.
In: Handbuch der physiologischen und pathologisch-
chemischen Analyse. Herausgeber: K. LANG, E. LEHNARZT,
O. HOFFMANN-OSTENHOF, G. SIEBERT. 6. Band, Teil A.
S. 292. Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York 1964.
7. CARSON, P.E., C.L. FLANAGAN, C.E. ICKES, A.S. ALVING:
Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythro-
cytes. Science 124, 484 (1956).

8. CIRESA, M., H. HUBER, P.v. DITTRICH: Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und Lebensdauer der Erythrocyten bei verschiedenen Anämieformen. Klin. Wschr. 42, 647 (1964).
9. DELBRÜCK, A., E. ZEBE, Th. BÜCHER: Über die Verteilungsmuster von Enzymen des energeiliefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von *Locusta migratoria* und ihre cytologische Zuordnung. Biochem. Z. 331, 273 (1959).
10. FLATZ, G.: Die hereditäre Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Inaktivität. Med. Klin. 59, 325, 687 (1964).
11. GEHRMANN, G., A. STURM, D. AMELUNG: Favismus in Deutschland. Dtsch. med. Wschr. 88, 1865 (1963).
12. GRIGNANI, F., G.W. LÖHR: Über die Hexokinase in menschlichen Bluzellen. Klin. Wschr. 38, 796 (1960).
13. HADEN, R.L.: A new type of hereditary hemolytic jaundice without spherocytosis. Amer. J. med. Sci. 214, 255 (1947).
14. HASCHEN, R.J.: Enzymdiagnostik, Stuttgart 1970.
15. HENNEMANN, H.: Die Erhöhung der Glukose-6-Phosphat-dehydrogenaseaktivität der Erythrocyten und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 41, 1014 (1963).
16. HORECKER, B.L., P.Z. SMYRNIOTIS: 6-phosphogluconic dehydrogenase. In: Methods in enzymology I, p.323, edit. S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN. New York: Acad. Press 1955.
17. HUBER, H., M. CIRESA, N. SHIRAKURA: Über die Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in den Erythrocyten bei Leberzirrhose. Wien. Z. inn. Med. 44, 26 (1963).
18. KOLLER, S.: Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, Darmstadt 1969.

19. KRAUS, A.P.M., M.F. LANGSTROM, jr., B.L. LYNCH:
Red cell phosphoglycerate-kinase deficiency. Biochem. Res. Commun. 30, 173 (1968).
20. KUBOWITZ, F., P. OTT: Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. Biochem. Z. 314, 94 (1943).
21. LAUSECKER, CH., P. HEIDT, D. FISCHER, H. HARTLEYB, G.W. LÖHR: Anémie hémolytique constitutionnelle avec déficit en 6-phospho-gluconate-deshydrogenase. Arch. franç. Pédiat. 22, 789 (1965).
22. LÖHR, G.W.: Die enzymopenischen Erythropathien. Verh. Deutsch. Ges. Innere Med. 70, 495 (1964).
23. LÖHR, G.W., H.D. WALLER: persönl. Mitteilung.
24. LÖHR, G.W., H.D. WALLER: Zur Biochemie einiger angeborener hämolytischer Anämien. Folia haemat. (Frankfurt), N.F. 8, 377 (1963).
25. LÖHR, G.W., H.D. WALLER: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment). In: Methoden der enzymatischen Analyse. Herausgeber: H.U. BERGMAYER. S. 744. Weinheim a.d. Bergstraße 1962.
26. LÖHR, G.W., H.D. WALLER: Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen Anämien. Dtsch. med. Wschr. 86, 27, 87 (1961).
27. LÖHR, G.W., H.D. WALLER, F. ANSCHÜTZ, A. KNOPP: Hexokinasemangel in Blutzellen bei einer Sippe mit familiärer Panmyelopathie (Typ Fanconi). Klin. Wschr. 43, 870 (1965).
28. LÖHR, G.W., H.D. WALLER, F. ANSCHÜTZ, A. KNOPP: Biochemische Defekte in Blutzellen bei familiärer Panmyelopathie (Typ Fanconi). Humangenetik 1, 383 (1965).
29. LÖHR, G.W., H.D. WALLER, O. KARGES, B. SCHLEGEL, A.A. MÜLLER: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten. Klin. Wschr. 36, 1008 (1958).

30. MARKS, P.A.: Red cell glucose-6-phosphat and 6-phosphogluconic dehydrogenases and nucleosid phosphorylase. *Science* 127, 1338 (1958).
31. MARKS, P.A., R.T. GROSS: Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Evidence of differences between negroes and caucasians with respect to this genetically determined trait. *J. clin. Invest.* 38, 2253 (1959).
32. MESSERSCHMIDT, J., SUAUDEAU, C.: Le défaut en glucose-6-phosphat deshydrogénase en Algérie. *Proc. 10th Congr. Europ. Soc. Haemat.* II/1, 312, Straßburg 1965.
33. MICHOT, F, H.R. MARTI: Die klinische Bedeutung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität der Erythrocyten. *Schweiz. med. Wschr.* 95, 1450 (1965).
34. OHLER, W.G.A.: Die klinische Bedeutung der intrathrombocytären Fermente des Kohlehydratstoffwechsels. *Habilitationsschrift*, Mainz 1966.
35. RACKER, E.: Glutathion reductase (liver and yeast). In: *Methods in enzymology* II, edit. S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN, p. 722. New York: Acad. Press. 1955.
36. RACKER, E.: *Zit. nach* G. BEISENHERZ, H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R.CZOK et al. (1).
37. SACHS, L.: *Statistische Auswertungsmethoden*. Heidelberg 1969.
38. Schneider, A.S., W.N. VALENTINE, M. HATTORI, H.L. HEINS, jr.: Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *New. Engl. J. Med.* 272, 229 (1965).
39. SCHRÖTER, W.: Frühkindliche Manifestation erythrocytärer Enzymdefekte. *Dtsch. med. Wschr.* 93, 1202 (1968).
40. TANAKA, K.R., W.N. VALENTINE, S.MIWA: Pyruvate kinase hereditary non-spherocytic hemolytic anemia. *Blood* 19, 267 (1962).
41. VALENTINE, W.N., F.A. OSKI, A.S. SCHNEIDER : Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency. *New Engl. J. Med.* 276, 1 (1967).

42. VALENTINE, W.N., K.R. TANAKA, S. MIWA: A specific erythrocyte glycolytic enzyme defekt (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. Trans. Ass. Amer. Phycns. 74, 100 (1961)
43. VOGELL, W., F.R. Bishay, Th. BÜCHER, M. KLINGENBERG, D. PETTE, E. ZEBE: Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln von *Locusta migratoria*. Biochem. Z. 332, 81 (1959).
44. WALLER, H.D.: Beziehung zwischen Zellstoffwechsel und Zellalterung. Habilitationsschrift, Marburg 1960.
45. WALLER, H.D., G.W. LÖHR, M. TABATABAI: Hämolyse und Fehlen von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in roten Blutzellen (eine Fermentanomalie der Erythrocyten). Klin. Wschr. 35, 1022 (1957).
46. WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin 1948.
47. WIESMANN, U., O. TÖNZ: Investigations of the kinetics of red cell pyruvate kinase in normal individuals and in a patient with pyruvate kinase deficiency. Nature 201, 612 (1966).
48. WINTROBE, M.M.: A simple and accurate hematokrit. J. Lab. clin. Med. 15, 287 (1928).
49. WITT, I., H. MÜLLER, W. KUNZER: Vergleichende biochemische Untersuchungen an Erythrocyten aus Neugeborenen- und Erwachsenen-Blut. Klin. Wschr. 45, 262 (1967).

Lebenslauf.

Am 4.11.1943 wurde ich als Sohn des Fabrikanten Arno Franke, der am 10.8.1958 verstarb, und seiner Ehefrau Helene, geb. Parthum, in Limbach/Sachsen geboren.

Ab Herbst 1950 besuchte ich die Grundschule in Limbach, von Ostern 1955 bis Herbst 1955 das Zinsendorf-Gymnasium in Königsfeld/Schwarzwald und anschließend das Rhabanus-Maurus-Gymnasium in Mainz. Dort bestand ich am 16.2.1963 das Abitur.

Im SS. 1963 studierte ich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz Volkswirtschaft und wechselte im WS. 63/64 in die Medizinische Fakultät über. Nach 2 Semestern bestand ich das Vorphysikum und nach weiteren 3 Semestern das Physikum. Im WS. 66/67 studierte ich in Wien. Am 24.6.1969 bestand ich an der Universität Mainz das Medizinische Staatsexamen.

Vom 15.10.69 bis 15.1.70 war ich an der Universitätskinderklinik in Mainz und vom 16.1.70 bis 16.5.70 an der Chirurgischen Abteilung des St.Vincenz-Krankenhauses in Datteln/Westfalen Medizinalassistent. Von Juni bis September 1970 bereiste ich den Mittleren Osten. Vom 1.10.70 bis 28.2.71 war ich Medizinalassistent an der I. Medizinischen Universitätsklinik in Mainz. Am 3.3.1971 erhielt ich meine Approbation als Arzt.

Seit dem 15.3.1971 bin ich als Assistenzarzt an der Universitätskinderklinik in Mainz tätig.

